

23374

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. September 2004 (10.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/077044 A1(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 27/74, 33/543

(75) Erfinder; und

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000149

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MIETHE, Peter [DE/DE]; Dorfstrasse 42, 06632 Schleberoda (DE). KRAUSE, Hans-Joachim [DE/DE]; Pablo-Picasso-Strasse 30, 52499 Baesweiler (DE). ZHANG, Yi [DE/DE]; Nordstrasse 36, 52428 Jülich (DE). WOLTERS, Norbert [NL/DE]; Katharinenstrasse 8, 52134 Herzogenrath (DE). PLAKSIN, Dmitry [RU/DE]; Prinzengracht 11, 52428 Jülich (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Januar 2004 (30.01.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Fachbereich Patente, 52425 Jülich (DE).

(30) Angaben zur Priorität:  
103 09 132.7 28. Februar 2003 (28.02.2003) DE

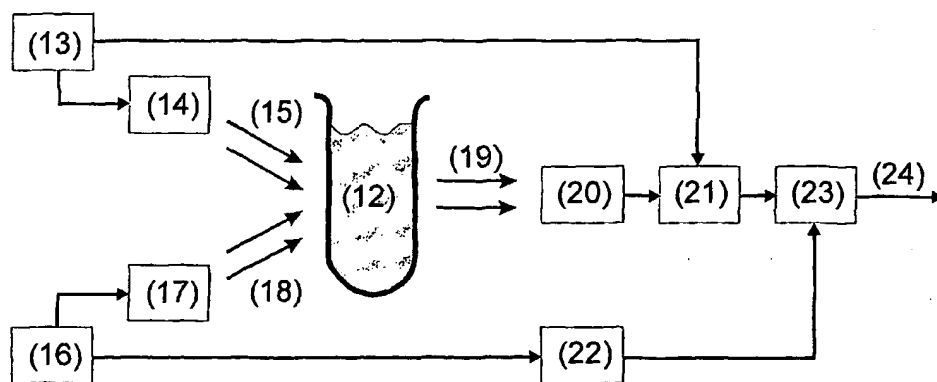
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR SELECTIVELY DETECTING FERROMAGNETIC OR SUPERPARAMAGNETIC PARTICLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM SELEKTIVEN NACHWEIS FERROMAGNETISCHER ODER SUPERPARAMAGNETISCHER PARTIKEL



(57) Abstract: The invention relates to a method for selectively detecting and/or quantifying superparamagnetic and/or ferromagnetic particles on analytes. The method is characterized in that a frequency component of magnetic fields (15, 18), which is generated due to the non-linearity of the magnetization characteristic curve of the particles, is measured at a mixing frequency. A device for selectively detecting and/or quantifying superparamagnetic and/or ferromagnetic particles on analytes comprises: a container (12) that contains particles, which are to be detected and/or quantified, on analytes; at least one oscillator (13, 16; 25) for generating frequencies of alternating magnetic fields (15, 18); at least one field generator (14, 17) for subjecting the analytes to alternating magnetic fields (15, 18); a magnetic field sensor (20) for measuring a response magnetic field (19) of the particles, and; at least one phase-sensitive detector (21, 23). These elements are configured in such a manner as to enable a frequency component of the magnetic fields (15, 18), which is generated due to the non-linearity of the magnetization characteristic curve of the particles, to be measured at a mixing frequency.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/077044 A1



KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Ein Verfahren zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel an Analyten. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel erzeugte Frequenz-Komponente von Magnetfeldern (15, 18) bei einer Mischfrequenz gemessen wird. Eine Vorrichtung zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel an Analyten umfasst: einen Behälter (12) mit nachzuweisendem und/oder zu quantifizierenden Partikeln am Analyten, mindestens einen Oszillator (13, 16; 25), zur Erzeugung von Frequenzen von Wechsel-Magnetfeldern (15, 18), mindestens einen Feldgenerator (14, 17) zur Beaufschlagung des Analyten mit Wechsel-Magnetfeldern (15, 18), einen Magnetfeldsensor (20), zur Messung eines Antwort-Magnetfeldes (19) der Partikel, mindestens einen phasenempfindlichen Detektor (21, 23), wobei die Bauteile so konfiguriert sind, dass eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel erzeugte Frequenz-Komponente der Magnetfelder (15, 18) bei einer Mischfrequenz gemessen wird.

## B e s c h r e i b u n g

## VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM SELEKTIVEN NACHWEIS FERROMAGNETISCHER ODER SUPERPARAMAGNETISCHER PARTIKEL

---

Die Erfindung betrifft den Nachweis magnetischer Partikel als Marker an Analyten.

5 Aus dem Stand der Technik sind Nachweisverfahren von Analyten mittels Fluorochromen, Enzymen oder radioaktiver Teilchen als sogenannte Marker für Analyten bekannt. Nachteilig ist der lineare Detektionsbereich von Fluoreszenzmarkern bzw. die Empfindlichkeit enzymatischer Techniken begrenzt. Radioaktive Marker sind auf-  
10 grund der Strahlenschutzanforderungen problematisch.

Bioassays auf der Basis magnetischer Markierung des Analyten sind hierzu eine Alternative. Die magnetischen Partikel bestehen aus einem Eisenoxid-Kern mit definierten Durchmessern von einigen zehn bis einigen hundert Nanometern. Sie weisen eine biokompatible Oberflächenbeschichtung auf, mit der sie an den Analyten,  
15 z. B. an chemische Substanzen, oder an die Oberfläche von Zellen oder Viren in an sich bekannter Weise gebunden werden.  
20

Vorteilhaft sind derartige Marker stabil, ungiftig und mittels magnetischer Felder manipulierbar. Partikel aus Eisenoxid sind superparamagnetisch. Das Vorhandensein magnetischer Partikel in einem Probenvolumen kann durch  
25 Wechselfeld-Suszeptometrie bestimmt werden. Im Falle der Monodispersität, d.h. einheitlicher Partikelgröße,

kann die Konzentration der Partikel auch quantitativ bestimmt werden.

5 Aus US 6,110,660 ist der Nachweis magnetischer Partikel mittels Suszeptometrie bekannt. Dabei wird die magnetische Suszeptibilität eines Analyten mittels einer Maxwell-Brücke im Frequenzbereich um 200 kHz gemessen. Die gemessene elektrische Spannung an einem Ausgangsverstärker der Brücke ist der Suszeptibilität der Lösung proportional. Bei konstanter Partikelgröße ist wiederum  
10 die Suszeptibilität proportional zur Anzahl der magnetischen Partikel in Lösung.

Nachteilig ist dieses Verfahren nicht selektiv. Zwar ist die magnetische Suszeptibilität konzentrierter Nanopartikel-Lösungen hoch. Allerdings erfordern Immunoassay-Verfahren in der Regel den Nachweis sehr geringer  
15 Konzentrationen von Biomolekülen und dementsprechend sehr geringe Konzentrationen magnetischer Marker-Partikel. Die resultierende Suszeptibilität der Lösung ist dann sehr klein und kaum von der Suszeptibilität einer Vergleichslösung ohne magnetische Partikel zu unterscheiden. Die Erhöhung der Verstärkung am Ausgang der Maxwell-Brücke ist keine brauchbare Lösung dieses Problems, weil parasitäre Effekte wie Suszeptibilitätsvariationen der Probengefäße, der Reagenzien und der  
20 Laborumgebung ebenso zu Streuungen in der Ausgangsspannung führen wie thermische Effekte und elektronisches Driften der Bauteile der Ausleseschaltung.  
25

Aus US 6,046,585 ist die Bewegung von Magnetpartikel-Proben zur Erzielung einer niederfrequenten Modulation

des Messsignals unter Verwendung eines gradiometrischen SQUID-Magnetfelddetektors bekannt. Nachteilig werden etwaige Signale der Probenhalterung und der Probengefäße mit diesem Verfahren nicht unterdrückt.

- 5 Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum selektiven Nachweis superpara- und/oder ferromagnetischer Partikel bereit zu stellen, welches mit geringem apparativen Aufwand hochsensitiv solche Partikel nachzuweisen vermag. Aufgabe der Erfindung ist es weiter eine  
10 diesbezügliche Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens bereit zu stellen.

- Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß Hauptanspruch und durch eine Vorrichtung gemäß Nebenanspruch gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus  
15 den darauf jeweils rückbezogenen Patentansprüchen.

- Zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel wird eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel erzeugte Frequenz-  
20 Komponente von Magnetfeldern bei einer Mischfrequenz gemessen.

- Superpara- und ferromagnetische Stoffe weisen eine nichtlineare Magnetisierungskennlinie auf, eine Eigenschaft, welche erfindungsgemäß zum selektiven Nachweis  
25 dieser Stoffe genutzt wird. Das Verfahren nutzt die Abhängigkeit der differentiellen Suszeptibilität, (das heißt die Ableitung der magnetischen Suszeptibilität

nach dem Magnetfeld) der Partikel von dem auf die Partikel einwirkenden Magnetfeld, aus.

Die Partikel werden mit einem ersten Wechsel-Magnetfeld beaufschlagt. Dies hat eine Aussteuerung der Magnetisierungs-kennlinie der Partikel zur Folge (Aussteuer-Magnetfeld).

Bevorzugt weist das Aussteuer-Magnetfeld eine Frequenz zwischen 50 und 100 Hertz auf. Durch Auswahl solcher niederfrequenter Wechsel-Magnetfelder können niedrige Ströme und Spannungen verwendet werden.

Die Partikel werden zudem mit einem zweiten Wechsel-Magnetfeld mit einer zum Aussteuer-Magnetfeld verschiedenen Frequenz beaufschlagt. Das zweite Wechsel-Magnetfeld dient der Abtastung der Nichtlinearität der Magnetisierungs-kennlinie der Partikel (Abtast-Magnetfeld).

Als Folge tritt ein auf Grund der Einwirkung der beiden Wechsel-Magnetfelder induziertes Antwort-Magnetfeld der magnetischen Partikel auf, welches gemessen wird.

Das Abtast-Magnetfeld kann vorteilhaft eine Frequenz zwischen 10 und 100 Kilohertz aufweisen. Dadurch wird im Falle der Verwendung einer Induktionsspule als Magnetfeldsensor vorteilhaft bewirkt, dass die in dieser Spule durch das Antwort-Magnetfeld induzierte Spannung, die der Frequenz des Antwort-Magnetfeldes proportional ist, hoch und damit leichter messbar ist.

Die auftretende Amplitudenvariation des Antwort-Magnetfeldes ist primär abhängig von der Art und der Konzentration der magnetischen Partikel. Superpara- und ferromagnetische Stoffe weisen - wie erwähnt- eine nicht-lineare Magnetisierungskennlinie auf. Auf Grund der nicht-linearen Magnetisierungskennlinie lassen sich die genannten Stoffe selektiv nachweisen.

Das Antwort-Magnetfeld weist an einem Sensor Frequenz-Mischkomponenten der beiden auf die magnetischen Partikel beaufschlagten Wechsel-Magnetfelder auf. Eine solche Komponente kann durch geeignete phasenempfindliche Detektion (Demodulation) nachgewiesen werden. Die dadurch erzeugte Spannung entspricht dem Amplitudenverlauf der Komponente und wird als Ausgangssignal zur Bestimmung der Konzentration des Analyten herangezogen.

Besonders vorteilhaft wird der zeitliche Verlauf der Amplitude (Amplitudenvariation) des Antwort-Magnetfeldes durch phasenempfindliche Detektion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes gemessen. Im Falle superpara- und ferromagnetischer Analyten weist der zeitliche Verlauf der Amplitude des Antwort-Magnetfeldes Frequenzkomponenten auf, die Vielfache der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes sind. Besonders ausgeprägt sind geradzahlige Vielfache, und dabei insbesondere die Komponente mit der doppelten Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes.

Der Grund dafür ist, dass das Aussteuer-Magnetfeld zu einer verzerrten magnetischen Induktion der magnetischen Partikel führt. Das zusätzlich aufgebrauchte Ab-

tast-Magnetfeld hat in dem Falle, dass die durch das Aussteuer-Magnetfeld vorliegende momentane magnetische Induktion gerade einen Nulldurchgang durchläuft, eine große zusätzliche magnetische Induktion zur Folge. In dem Falle, dass die Aussteuer-Induktion gerade ein Betragmaximum aufweist, führt das Abtast-Magnetfeld hingegen nur zu einer kleinen, zusätzlichen Induktion. Die Amplitude wird nämlich durch die Ableitung der Magnetisierungskurve der magnetischen Partikel kontrolliert, die im Falle großer Magnetfelder aufgrund des Sättigungseffektes geringer ist als im Falle kleiner Magnetfelder.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Amplitude des Antwort-Magnetfeldes bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes als Funktion der Zeit, so variiert diese Amplitude gerade mit der doppelten Frequenz der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes. Sie hat ihre Minima bei den Extrema der Aussteuerung und ihre Maxima bei den Nulldurchgängen.

Die Amplitudenvariation des Antwort-Magnetfeldes wird zweckmäßig durch phasenempfindliche Detektion demoduliert. Das Antwort-Magnetfeld wird zweckmäßig durch einen Magnetfeldsensor in eine elektrische Spannung gewandelt und gegebenenfalls verstärkt.

Die resultierende Ausgangsspannung ist im Falle monodisperser Partikel vorteilhaft linear proportional der Konzentration des Analyten, welche nach Kalibration des Messsystems entsprechend berechnet wird.



5 Eine Vorrichtung zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel mittels Messung der differentiellen Suszeptibilität der Partikel, umfasst einen Behälter mit den nachzuweisendem und/oder zu quantifizierenden Partikeln am Analyten. Der Behälter kann aus einem für das Verfahren geeigneten, nicht magnetischen Material, das heißt z. B. aus Glas oder Kunststoff, bestehen.

10 Die Vorrichtung umfasst mindestens einen Oszillator. Der Oszillator ist geeignet, um Frequenzen von Wechsel-Magnetfeldern, wie im vorliegenden Fall nötig, zu erzeugen.

15 Besonders vorteilhaft umfasst die Vorrichtung einen Basisfrequenz-Oszillator, aus dem die Frequenzen des Abtast- und des Aussteuer-Magnetfeldes mittels Frequenzteilern phasenstarr abgeleitet werden.

20 Es können aber auch zwei Oszillatoren zur unabhängigen Erzeugung beider Wechsel-Magnetfelder verwendet werden. Ein erster Oszillator erzeugt dann die Frequenz des Abtast-Magnetfeldes, ein zweiter Oszillator die Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes.

25 Die Vorrichtung weist zudem mindestens einen Feldgenerator auf. Dieser dient zur Beaufschlagung des Analyten mit den Wechsel-Magnetfeldern. Es können besonders vorteilhaft zwei solcher Feldgeneratoren vorliegen, die den Analyten mit dem ersten bzw. zweiten Wechsel-

Magnetfeld, also dem Aussteuer-Magnetfeld und dem Abtast-Magnetfeld, beaufschlagen.

Die Vorrichtung umfasst einen Magnetfeldsensor, der der Aufnahme eines Antwort-Magnetfeldes der Partikel dient.  
5 Der Magnetfeldsensor wandelt und verstärkt die Amplitudenvariation des Antwort-Magnetfeldes der Partikel und leitet sie an einen phasenempfindlichen Detektor weiter.

Die Vorrichtung umfasst ferner mindestens einen phasenempfindlichen Detektor, der von einem Oszillator gegebenenfalls über einen Frequenzteiler mit einer Referenzfrequenz gespeist wird. Der phasenempfindliche Detektor ermittelt die Amplitude des Antwort-Magnetfeldes bei dieser Frequenz.  
10

Die Vorrichtung kann mindestens einen zweiten phasenempfindlichen Detektor umfassen, der ebenfalls von einem Oszillator gegebenenfalls über einen Frequenzteiler mit einer Referenzfrequenz gespeist wird.  
15

In diesem Falle würde der erste phasenempfindliche Detektor zweckmäßigerweise mit der Abtastfrequenz als Referenz gespeist und dementsprechend die Amplitude des Antwortmagnetfeldes bei der Abtastfrequenz liefern. Der zweite phasenempfindliche Detektor würde als Referenz mit einem Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes gespeist. Der zweite phasenempfindliche Detektor untersucht die Amplitude des Antwort-Magnetfeldes, welche über den ersten phasenempfindlichen Detektor an den zweiten phasenempfindlichen Detektor geleitet wird, auf eine Frequenzkomponente, die einem geradzahligen Viel-  
20  
25

fachen, insbesondere dem Doppelten der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes entspricht. Der zweite phasenempfindliche Detektor erzeugt eine Ausgangsspannung, die der Amplitude dieser Frequenzkomponente entspricht.

- 5 Zur Maximierung der demodulierten Signale kann die Vorrichtung ferner Phasenschieber an den Referenzeingängen der phasenempfindlichen Detektoren beinhalten.

10 Im weiteren wird die Erfindung an Hand von Ausführungsbeispielen und der beigefügten Figuren 1 bis 8 näher beschrieben.

- Figur 1 veranschaulicht die zugrundeliegende physikalische Eigenschaft superparamagnetischer und ferromagnetischer Materialien. Derartige Materialien weisen eine nicht-lineare Magnetisierungskennlinie auf (Fig. 1b).
- 15 Im Gegensatz hierzu weisen diamagnetische und paramagnetische Materialien eine lineare Magnetisierungskennlinie auf (Fig. 1a).

20 Die Substanz werde mit einem Wechselfeld der Frequenz  $f$  und der Amplitude  $H_a$  beaufschlagt. Ein etwaiges zusätzlich vorhandenes statisches Magnetfeld, z. B. das Erdmagnetfeld, werde mit  $H_0$  bezeichnet.

$$H(t) = H_a \sin(2\pi ft) + H_0 \quad (1)$$

- Figur 1a stellt die magnetische Aussteuer-Induktion 3 einer paramagnetischen Substanz auf ein Aussteuer-
- 25 Magnetfeld 1 dar. Eine paramagnetische Substanz ist charakterisiert durch eine konstante Permeabilität

$\mu = \mu_0 \mu_r$  mit  $\mu_r > 1$ . Dabei bezeichnet  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \frac{Vs}{Am}$  die Permeabilität des Vakuums und  $\mu_r$  die relative Permeabilität oder Permeabilitätszahl des Materials. Die resultierende magnetische Aussteuer-Induktion 3

$$5 \quad B(t) = \mu_0 \mu_r H_a \sin(2\pi f t) + \mu_0 \mu_r H_0 \quad (2)$$

ist, wie in Figur 1a gezeigt, unverändert sinusförmig. Ein paramagnetisches Material mit einer linearen Magnetisierungskennlinie 2 liefert also eine unverzerrte Antwort. Das gleiche gilt entsprechend für diamagnetische Materialien mit konstanter relativer Permeabilität  $\mu_r < 1$ .

Superparamagnetische Substanzen weisen die erwähnte nicht-lineare und nicht-hysteretische Magnetisierungskennlinie 5 auf. Die Magnetisierung  $M(H)$  superparamagnetischer Substanzen lässt sich im allgemeinen durch die Formel

$$15 \quad M(H) = M_s L \left( \frac{\mu_0 H}{B_c} \right) \quad (3)$$

beschreiben. Dabei bezeichnet

$$L(x) = \coth(x) - \frac{1}{x} \quad (4)$$

die Langevin-Funktion,  $B_c$  die charakteristische Induktion,  $M_s$  die Sättigungsmagnetisierung der Partikel und  $x = \frac{\mu_0 H}{B_c}$  das Argument der Langevin-Funktion.

Die typische magnetische Antwort eines superparamagnetischen Materials ist durch die verzerrte Sinusfunktion als magnetische Aussteuer-Induktion 6 in Fig. 1b dargestellt und lässt sich im allgemeinen durch Einsetzen von Formel (1) in Formel (3) gemäß Formel (5) beschreiben:

$$B(t) = M_s L \left( \frac{\mu_0}{B_c} [H_a \sin(2\pi f t) + H_0] \right) \quad (5)$$

Erfindungsgemäß wird ein Aussteuer-Magnetfeld 4 zur Aussteuerung der Magnetisierungskennlinie 5 verwendet. Das Aussteuer-Magnetfeld 4 ist ein Wechsel-Magnetfeld mit bestimmter Frequenz  $f$ .

Zusätzlich wird der Analyt mit einem zweiten Wechsel-Magnetfeld (nicht dargestellt), einem sogenannten Abtast-Magnetfeld, beaufschlagt. Die Frequenz des Abtast-Magnetfeldes wird verschieden von der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4 gewählt.

Figur 2 erläutert das dem Verfahren zugrunde liegende Prinzip. Figur 2b kennzeichnet den Fall eines superparamagnetischen oder ferromagnetischen Analyten und Fig. 2a den eines diamagnetischen oder paramagnetischen Analyten. Das Aussteuer-Magnetfeld 4 führt, wie in Fig. 1 gezeigt, zu einer verzerrten magnetischen Aussteuer-

Induktion 6, deren zeitliche Abhängigkeit durch Formel (5) beschrieben wird. Das zusätzlich aufgebrachte zweite Wechsel-Magnetfeld führt als Abtast-Magnetfeld in dem Falle, dass die durch das Aussteuer-Magnetfeld 4 erzeugte magnetische Aussteuer-Induktion 6 seinen Null-  
5 durchgang durchläuft, zu einer großen zusätzlichen Abtast-Induktion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (Figur 2b, Nr. 9).

In dem Falle, dass die durch das erste Wechsel-Magnetfeld (Aussteuer-Magnetfeld 4) erzeugte Induktion 6 ein  
10 Betragsmaximum aufweist, führt das Abtast-Magnetfeld nur zu einer kleinen zusätzlichen Induktion (Figur 2b, Nr. 10).

Die Amplitude des Antwort-Magnetfeldes 11 wird nämlich  
15 durch die Ableitung der Magnetisierungskennlinie kontrolliert. Im Falle superparamagnetischer oder ferromagnetischer Substanzen ist diese Steigung der Magnetisierungskennlinie im Falle großer Magnetfelder  $|H|$  erheblich kleiner als im Ursprung bei  $H = 0$ . Für superpa-  
20 ramagnetische Substanzen mit einer Magnetisierungskennlinie gemäß Gleichung (5) ergibt sich diese Aussage durch Betrachten der Ableitung der Langevin-Funktion,

$$\frac{dL(x)}{dx} = 1 - \coth(x)^2 - \frac{1}{x^2} \quad (6)$$

die für große  $|x|$  erheblich kleiner ist als im Ursprung  
25 bei  $x = 0$ .

Stellt man den Verlauf der Amplitude 11 der magnetischen Induktion, das heißt des Antwort-Magnetfeldes, bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes als Funktion der Zeit dar, so erkennt man, dass diese Amplitude 11 gerade mit der doppelten Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4 variiert. Sie hat ihre Minima bei den Extrema und ihre Maxima bei den Nulldurchgängen des Aussteuer-Magnetfeldes 4 bzw. der magnetischen Aussteuer-Induktion 6.

Im Falle eines paramagnetischen Analyten erhält man aufgrund der linearen Magnetisierungskennlinie 2 in Figur 1 eine unverzerrte magnetische Induktion 3 durch das Aussteuer-Magnetfeld 1. Somit erhält man eine gleichbleibende Amplitude 8 der zusätzlichen Induktion 7 aufgrund des Abtast-Magnetfeldes unabhängig davon, welchen Wert das Aussteuer-Magnetfeld 1 bzw. die Aussteuer-Induktion 3 gerade annimmt (Figur 2a, Nr. 7). Die entsprechende Amplitude 8 der magnetischen Induktion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes ist zeitlich konstant.

Neben der doppelten Frequenz der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4 (bzw. Aussteuer-Induktion 6) enthält die Amplitude 11 des Aussteuer-Magnetfeldes 4 bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes auch höhere Harmonische der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4. Bei einer symmetrischen Aussteuerung der Magnetisierungskennlinie 5 (d.h.  $H_0 = 0$ ) findet man allerdings nur Frequenzkomponenten bei geradzahligen Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 4. Bringt man zusätzlich ein statisches Gleichfeld  $H_0$  auf den Analyten

auf, so erhält man zusätzliche Frequenzkomponenten bei ungeradzahligen Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes.

Das Verfahren weist den Vorteil auf, daß nur Analyten  
5 mit nicht-linearer Magnetisierungskennlinie 5 eine zeitliche Variation der Amplitude 11 zeigen, wie in Fig. 2b gezeigt. Paramagnetische oder diamagnetische Substanzen mit linearer Magnetisierungskennlinie 2 hingegen weisen eine konstante Amplitude 8 der magnetischen Induktion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes auf (Fig. 2a). Diese Selektivität zeichnet das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber den Verfahren gemäß Stand der Technik aus, die nicht unterscheiden, ob die gemessene Suszeptibilität von einem dia- bzw. paramagnetischen oder einem super- bzw. ferroparamagnetischen  
10 Material herrührt.  
15

Figur 3 zeigt eine erste Vorrichtung zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superpara- und/oder ferromagnetischer Partikel an Analyten. Die  
20 Bauteile sind so konfiguriert, dass eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie 5 der Partikel erzeugte Frequenz-Komponente der Magnetfelder 15, 18 bei einer Mischfrequenz gemessen wird.

Erforderlich sind ein geeigneter Behälter 12, in dem  
25 sich ein Analyt in einem Meßvolumen befindet. Der Analyt kann durch an sich bekannte Verfahren wie selektive Physisorptionsreaktion, Chemisorptionsreaktion, Präzipitation, Filtration, oder Extraktion in den Behälter 12 eingebracht werden. An den Analyten sind nachzuwei-



sende superpara- und/oder ferromagnetische Partikel gekoppelt.

Ein Oszillator 16 erzeugt die Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18, welches mittels eines Feldgenerators  
5 17 dem Analyten beaufschlagt wird.

Ein Oszillator 13 erzeugt die Frequenz eines zweiten Wechsel-Magnetfeldes, des Abtast-Magnetfeldes 15, welches mittels eines weiteren Feldgenerators 14 dem Analyten beaufschlagt wird.

10 Das von den Partikeln bzw. Analyten ausgehende Antwort-Magnetfeld 19 wird von einem Magnetfeldsensor 20 in eine elektrische Spannung gewandelt und vorverstärkt.

Ferner umfasst die Vorrichtung einen ersten phasenempfindlichen Detektor 21, der die Frequenz des Abtast-Magnetfeldes 15 vom Oszillator 13 als Referenz eingespeist bekommt. Dieser phasenempfindliche Detektor 21 ermittelt den zeitlichen Verlauf der Amplitude (s. Fig. 2, Nr. 11 bzw. 8) des Antwort-Magnetfeldes 19 bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes 15. Diese Amplitude 11  
15 bzw. 8 wird durch einen zweiten phasenempfindlichen Detektor 23, der durch Oszillator 16 die Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18 über einen  $m$ -fachen Frequenzvervielfacher 22 als Referenz gespeist bekommt, auf eine Frequenzkomponente untersucht, die dem  $m$ -fachen  
20 Vielfachen der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18 entspricht, mit einer ganzen, positiven Zahl  $m$ . Bevorzugt wird  $m$  gerade gewählt, besonders bevorzugt ist  
25  $m = 2$ . Die erzeugte Ausgangsspannung 24 entspricht der

Amplitude dieser Frequenzkomponente. Es wird eine Frequenz-Komponente bei einer Mischfrequenz gemessen, die nur bei Vorliegen einer Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel auftritt.

- 5        Sofern die Detektionskette 19 bis 23 linear arbeitet, ist die Ausgangsspannung 24 linear vom superparamagnetischen/ferromagnetischen Moment im Probenvolumen von Behälter 12 abhängig.

- 10       Bei konstantem Moment der Einzel-Magnetpartikel im Analyten und konstantem Messvolumen ist die Konzentration der magnetischen Marker in der Probe proportional zur Ausgangsspannung 24. Die Amplitude des Aussteuer-Magnetfeldes 18 wird in vorteilhafter Weise derart gewählt, dass der Analyt in die magnetische Sättigung getrieben wird. Im Falle superparamagnetischer Partikel, deren Magnetisierungskennlinie durch Gleichung (3) beschreibbar ist, wird die Amplitude des Aussteuer-Magnetfeldes 18 in der Größenordnung des charakteristischen Feldes  $B_c$  der verwendeten superparamagnetischen Partikel gewählt. Die Krümmung der der Magnetisierungskennlinie (Gleichung 3) zugrundeliegenden Langevin-Funktion

$$\frac{d^2 L(x)}{dx^2} = -2 \coth(x) \cdot (1 - \coth(x)^2) - \frac{2}{x^3} \quad (7)$$

- 25       hat ihr Betragsmaximum bei  $x = 1,37$ . Besonders vorteilhaft ist also eine Amplitude des Aussteuer-Magnetfeldes 18 von  $\mu_0 H_a = 1,37 B_c$ . Die Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18 wird zur Aussteuerung der Magnetisierungs-

kennlinie 5 in vorteilhafter Weise niedrig gewählt,  
z. B. zwischen 50 Hz und 100 Hz, denn zur Erzeugung von  
Feldern derart niedriger Frequenzen können Spulen mit  
hoher Windungszahl und dementsprechend niedrige Ströme  
und Spannungen verwendet werden. Das Abtast-Magnetfeld  
15 wird in vorteilhafter Weise hochfrequent gewählt,  
z. B. zwischen 10 kHz und 100 kHz. Insbesondere bei der  
Verwendung von Induktionsspulen als Magnetfeldsensoren  
20 hat eine hohe Frequenz des zweiten Magnetfeldes den  
Vorteil, dass die der Frequenz proportionale induzierte  
Spannung 24 in der Messspule 20 hoch ist.

Ein etwaiges statisches Umgebungs-Gleichfeld wird in  
vorteilhafter Weise möglichst klein gewählt.

Figur 4 skizziert eine alternative Vorrichtung. Ein  
Quarzoszillator 25 wird zur Erzeugung einer Frequenz  
verwendet, die mittels dreier Frequenzteiler 26, 27 und  
28 heruntergeteilt wird. Die Teilungsverhältnisse der  
drei Teiler 26, 27 und 28 werden derart gewählt, dass  
sie jeweils

$$\frac{1}{\ell}, \frac{1}{m \cdot n} \text{ und } \frac{1}{n}$$

mit ganzen, positiven Zahlen  $\ell$  und  $n$  betragen. Die  
ganze, positive Zahl  $m$  bezeichnet das Vielfache der  
Aussteuer-Frequenz, das demoduliert wird. In vorteil-  
hafter Weise wird  $m$  gerade, in besonders vorteilhafter  
Weise wird  $m = 2$  gewählt. Die Feldgeneratoren 17 und 14  
erzeugen das Aussteuer-Magnetfeld 18 und das Abtast-  
Magnetfeld 15. Das Antwort-Magnetfeld 19 wird über eine

differentielle, das heißt gradiometrische Induktions-  
spule als Magnetfeldsensor 20 aufgenommen. Die Spule  
ist derart angefertigt, dass sie aus zwei identisch ge-  
fertigten, aber jeweils gegensinnig gewickelten, in Se-  
rie geschalteten Teilspulen besteht, wobei der Analyt  
im Behälter 12 nur in eine der beiden Teilspulen einge-  
taucht wird. Damit wird vorteilhaft erreicht, dass der  
parasitäre Effekt der direkten Induktion einer elektri-  
schen Spannung bei der Abtastfrequenz gering gehalten  
wird, so dass die Amplitude des Abtast-Magnetfeldes 15  
sehr hoch gewählt werden kann, ohne dass eine Übersteu-  
erung des Vorverstärkers des Magnetfeldsensors 20 ein-  
tritt. Auf diese Weise wird eine Steigerung der Emp-  
findlichkeit der Apparatur erreicht.

Ferner beinhaltet die Vorrichtung einen ersten phasen-  
empfindlichen Detektor 21, der die Frequenz des Abtast-  
Magnetfeldes 15 vom Frequenz-Teiler 26 als Referenz  
eingespeist bekommt und der den zeitlichen Verlauf der  
Amplitude (s. Fig. 2, Nr. 11 bzw. Nr. 8) des Antwort-  
Magnetfeldes 19 bei der Frequenz des Abtast-Magnetfel-  
des 15 ermittelt. Diese Amplitude 11 bzw. 8 wird durch  
einen zweiten phasenempfindlichen Detektor 23, auf eine  
Frequenzkomponente untersucht, die dem  $m$ -fachen Vielfa-  
chen der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes 18 ent-  
spricht, mit einer ganzen, positiven Zahl  $m$ . Diese Re-  
ferenzfrequenz wird im Ausführungsbeispiel der Figur 4  
von einem Frequenz-Teiler 28 direkt aus der Frequenz  
des Oszillators 25 heruntergeteilt, anstelle, wie im  
Beispiel der Figur 3, einen Frequenzvervielfacher ein-  
setzen zu müssen. In vorteilhafter Weise sind auf diese  
Weise alle drei Frequenzen phasenstarr gekoppelt, so

dass ein etwaiger Oszillator drift unerheblich für die Messung ist.

5 Nach den beiden phasenempfindlichen Detektoren 21 und 23 steht die Ausgangsspannung 24 als Messsignal zur Verfügung.

Figur 5 skizziert eine weitere Vorrichtung. Ein Quarz-  
oszillator 25 wurde als Frequenzbasis verwendet, die  
mittels dreier Frequenzteiler 29, 30 und 28 herunterge-  
teilt wurde. Die Teilungsverhältnisse der drei Teiler  
10 29, 30 und 28 werden derart gewählt, dass sie jeweils

$$\frac{1}{n+m}, \frac{1}{n(n+m)} \text{ und } \frac{1}{n}$$

mit ganzen, positiven Zahlen  $m$  und  $n$  betragen. Dabei  
bezeichnet  $m$  wieder das Vielfache der Aussteuer-Fre-  
quenz. In vorteilhafter Weise wird  $m$  gerade, in beson-  
15 ders vorteilhafter Weise wird  $m = 2$  gewählt. Die Vor-  
richtung aus Figur 5 beinhaltet nur einen phasenemp-  
findlichen Detektor 21, der die  $n$ -fach heruntergeteilte  
Frequenz des Oszillators 25 als Referenz eingespeist  
bekommt. Dieser phasenempfindliche Detektor 21 ermit-  
20 telt den zeitlichen Verlauf der gleichen Magnetfeldkom-  
ponente wie in den beiden vorher vorgestellten Ausführ-  
ungsbeispielen aus Fig. 3 und 4.

Experimentell wurden Proben verschiedener Konzentratio-  
nen von Magnetpartikeln hergestellt und vermessen. Dazu  
25 wurde eine Lösung von kolloidalen Eisenoxid-Partikeln  
im Nanometer-Größenbereich hergestellt und seriell mit

isotonischer Kochsalzlösung (PBS) verdünnt. Figur 6 zeigt die gemessene Ausgangsspannung mit Standardabweichung als Funktion der Eisen-Konzentration der Proben.

Figur 7 zeigt, wie die Messsignale einer Probe fester  
 5 Konzentration in Abhängigkeit von einem statischen Umgebungs-Gleichfeld  $H_0$  variieren. Maximale Ausgangsspannung erhält man bei minimalem Gleichfeld. Bei einer Gleichfeldamplitude von etwa 1,9 mT beobachtet man ein  
 10 Minimum der Ausgangsspannung, für höhere Gleichfelder steigt das Signal wieder an. Rechnerisch lässt sich zeigen, dass das Signal einen Verlauf wie die dritte Ableitung der Langevin-Funktion

$$\frac{d^3 L(x)}{dx^3} = -2(1 - \coth(x)^2)^2 + 4 \coth(x)^2 \cdot (1 - \coth(x)^2) + \frac{6}{x^4} \quad (8)$$

haben sollte. In Figur 7 ist vergleichsweise diese  
 15 Funktion mit skaliertem Amplitude und angepasstem charakteristischen Feldwert  $B_c = 1,4$  mT ( $x = \mu_0 H / B_c$ ) eingezeichnet. Die Übereinstimmung mit den Messwerten ist insbesondere für kleine statische Gleichfelder  $H_0$  beeindruckend gut.

Figur 8 stellt die gemessene Abhängigkeit der Ausgangsspannung einer Probe fester Konzentration in Abhängigkeit von der Amplitude des Aussteuer-Magnetfeldes dar. Durch Integration über den amplitudenabhängigen Signalverlauf wurde das zu erwartende Signal berechnet und in  
 20 Fig. 8 eingetragen. Die Übereinstimmung mit den Messwerten ist insbesondere für kleine Amplituden gut.

Das erfindungsgemäße Verfahren/Vorrichtung kann insbesondere für folgende Anwendungen verwendet werden:

- 5 Nachweis von chemischen Substanzen, Zellen oder Viren über die quantitative Erfassung der molekularen Wechselwirkung, insbesondere die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung und die Wechselwirkung zwischen Oligonucleotiden, wobei die superpara- und/oder ferromagnetischen Partikel an die Substanzen, Zellen oder auch Viren gekoppelt sind.

## Bezugszeichenliste

	1, 4, 18	Aussteuer-Magnetfeld
	2	Magnetisierungskennlinie, linear
5	3	Magnetische Aussteuer-Induktion bei linearer Magnetisierungskennlinie
	5	Magnetisierungskennlinie, nicht-linear
	6	Magnetische Aussteuer-Induktion bei nicht-linearer Magnetisierungskennlinie
10	7	zusätzliche Abtast-Induktion bei linearer Magnetisierungskennlinie
	8	Amplitude der magnetischen Induktion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes bei linearer Magnetisierungskennlinie
15	9, 10	zusätzliche Abtast-Induktion bei nicht-linearer Magnetisierungskennlinie bei Nulldurchgängen (9) und Extrema (10)
	11	Amplitude der magnetischen Induktion bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes bei nicht-linearer Magnetisierungskennlinie
20		
	13, 16, 25	Oszillator
	14, 17	Feldgenerator
	15	Abtast-Magnetfeld
25	19	Antwort-Magnetfeld
	20	Magnetfeldsensor
	21, 23	phasenempfindlicher Detektor
	24	Ausgangsspannung
	26, 27, 28,	Frequenz-Teiler
30	29, 30	



P a t e n t a n s p r ü c h e

---

1. Verfahren zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
5 eine aufgrund der Nichtlinearität der Magnetisierungskennlinie der Partikel erzeugte Frequenzkomponente von Magnetfeldern bei einer Mischfrequenz gemessen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
10 dadurch gekennzeichnet, dass  
die Partikel zur Aussteuerung ihrer Magnetisierungskennlinie (5) mit einem Aussteuer-Magnetfeld (4, 18) gegebener Frequenz beaufschlagt werden.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
15 bei dem das Aussteuer-Magnetfeld (4, 18) eine Frequenz zwischen 50 und 100 Hertz aufweist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
20 die Partikel mit einem Abtast-Magnetfeld (15) mit einer zum Aussteuer-Magnetfeld (4, 18) verschiedenen Frequenz beaufschlagt werden.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
bei dem das Abtast-Magnetfeld (15) eine Frequenz zwischen 10 und 100 Kilohertz aufweist.
- 25 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass

ein auf Grund der Einwirkung der beiden Wechsel-Magnetfelder (15, 18) induziertes Antwort-Magnetfeld (19) der Partikel gemessen wird.

- 5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplitudenvariation (8, 11) des Antwort-Magnetfeldes (19) bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (15) gemessen wird.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Frequenzkomponente der Amplitudenvariation (8, 11) des Antwort-Magnetfeldes (19) bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (15) gemessen wird, die ein ganzzahliges Vielfaches der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes (4, 18) beträgt.
- 15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Frequenzkomponente der Amplitudenvariation (8, 11) des Antwort-Magnetfeldes (19) bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (15) gemessen wird, die ein geradzahliges Vielfaches der Frequenz  
20 des Aussteuer-Magnetfeldes (4, 18) beträgt.
- 25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Frequenzkomponente der Amplitudenvariation (8, 11) des Antwort-Magnetfeldes (19) bei der Frequenz des Abtast-Magnetfeldes (15) gemessen wird, die das Doppelte der Frequenz des Aussteuer-Magnetfeldes (4, 18) beträgt.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplitudenvariation (11) des Antwort-

Magnetfeldes (19) gewandelt und als Ausgangsspannung (24) zur Bestimmung der Konzentration des Analyten verwendet wird.

- 5 12. Vorrichtung zum selektiven Nachweis und/oder zur Quantifizierung superparamagnetischer und/oder ferromagnetischer Partikel an Analyten umfassend:
- einen Behälter (12) mit nachzuweisendem und/oder zu quantifizierenden Analyten,
  - 10 - mindestens einen Oszillator (13, 16; 25), zur Erzeugung von Frequenzen von Wechsel-Magnetfeldern (15, 18),
  - mindestens einen Feldgenerator (14, 17) zur Beaufschlagung des Analyten mit Wechselmagnetfeldern (15, 18),
  - 15 - einen Magnetfeldsensor (20), zur Messung eines Antwort-Magnetfeldes (19) der Partikel, sowie
  - mindestens einen phasenempfindlichen Detektor (21, 23).
- 20 13. Vorrichtung nach Anspruch 12, umfassend mindestens einen Frequenz-Teiler (26, 27, 28, 29, 30) zur Teilung der Frequenz des Oszillators (25).
- 25 14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Frequenz-Teiler (26, 27, 28, 29, 30) die Oszillator-Frequenz im Verhältnis ganzer, positiver Zahlen teilen.
15. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass

die Frequenz-Teiler (26, 27, 28) die Oszillator-Frequenz in den Verhältnissen

$$\frac{1}{\ell}, \frac{1}{m \cdot n} \text{ und } \frac{1}{n}$$

teilen.

- 5      16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Frequenz-Teiler (28, 29, 30) die Oszillator-Frequenz in den Verhältnissen

$$\frac{1}{n}, \frac{1}{n+m} \text{ und } \frac{1}{n(n+m)}$$

10      teilen.

17. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 15 oder 16, mit ganzen, positiven Zahlen für  $\ell$ ,  $m$  und  $n$ .

- 15      18. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 15 bis 17, mit  $m$  als gerader Zahl, insbesondere mit  $m = 2$ .

- 20      19. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 13 bis 18, die mindestens eine in einem Frequenz-Teiler (26, 28) heruntergeteilte Oszillator-Frequenz als Referenz in mindestens einen phasenempfindlichen Detektor (21, 23) einspeist.

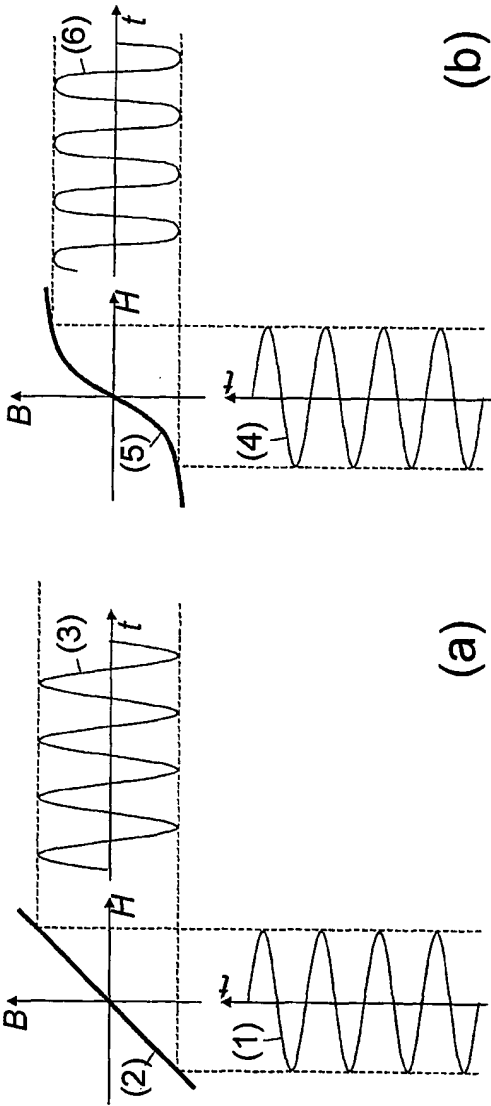
- 25      20. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 13 bis 19, die eine im Frequenz-Teiler (26) heruntergeteilte Oszillator-Frequenz als Referenz in einen phasen-

empfindlichen Detektor (21) und die eine im Frequenz-Teiler (28) heruntergeteilte Oszillator-Frequenz als Referenz in einen phasenempfindlichen Detektor (23) einspeist.

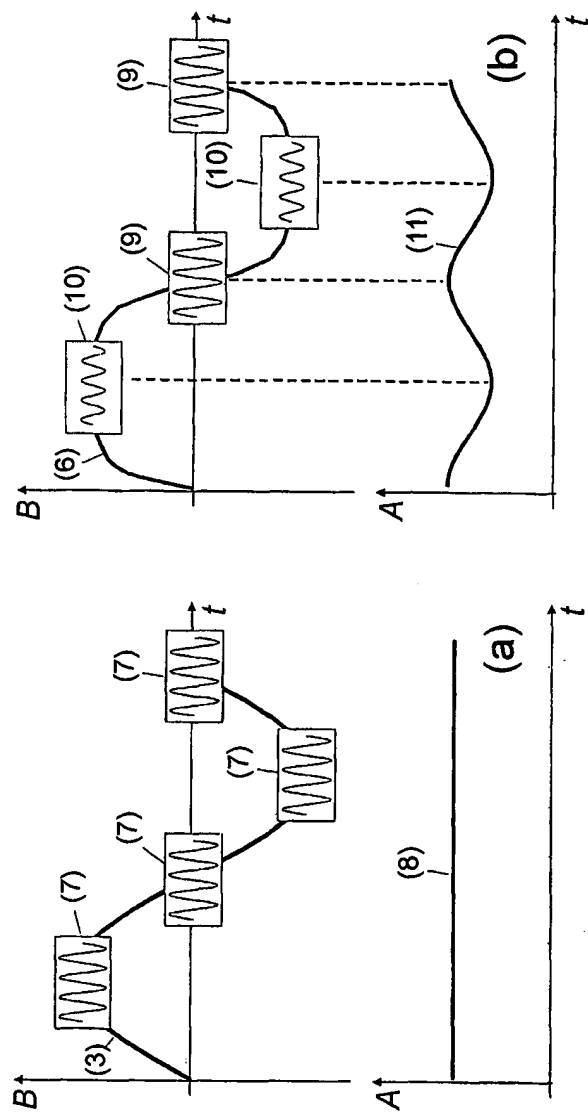
- 5        21. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche  
13 bis 20,  
gekennzeichnet durch,  
Feldgeneratoren (14, 17), die durch die Frequenzen  
der Frequenz-Teiler (26, 27; 29, 30) angesteuert  
10        werden.
22. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche  
12 bis 21,  
umfassend mindestens einen Frequenzvervielfacher  
(22).
- 15        23. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche  
12 bis 22,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
der Magnetfeldsensor (20) differentiell ausgebildet  
ist.
- 20        24. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche  
12 bis 23,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
der Magnetfeldsensor (20) zwei Teilspulen gleicher  
Bauart umfasst.
- 25        25. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche  
12 bis 24,  
dadurch gekennzeichnet, dass

die Teilspulen des Magnetfeldsensors (20) gegenseitig gewickelt sind.

26. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12 bis 25,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass  
die Teilspulen des Magnetfeldsensors (20) in Serie geschaltet sind.
27. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 12 bis 26,  
10 dadurch gekennzeichnet, dass  
der Behälter (12) mit den Analyten nur mit einem der beiden Teilspulen des Magnetfeldsensors (20) in Kontakt steht.

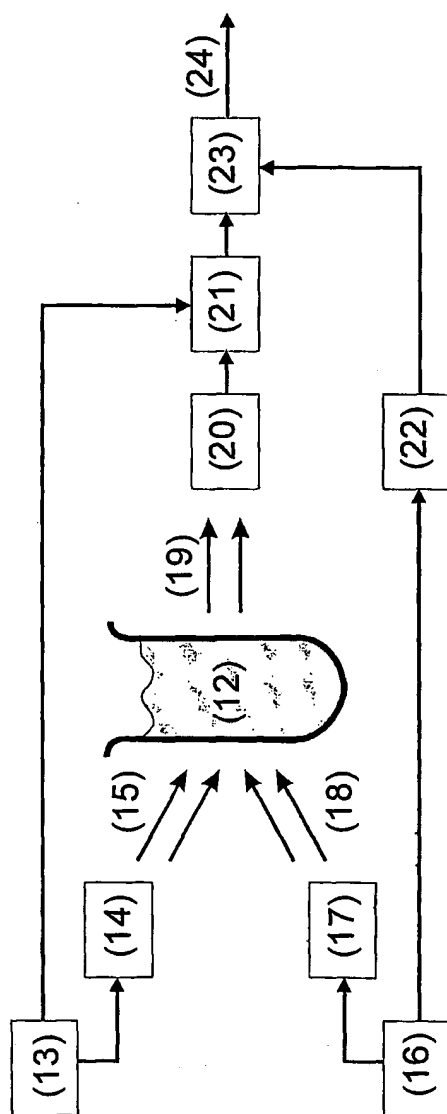


FIGUR 1

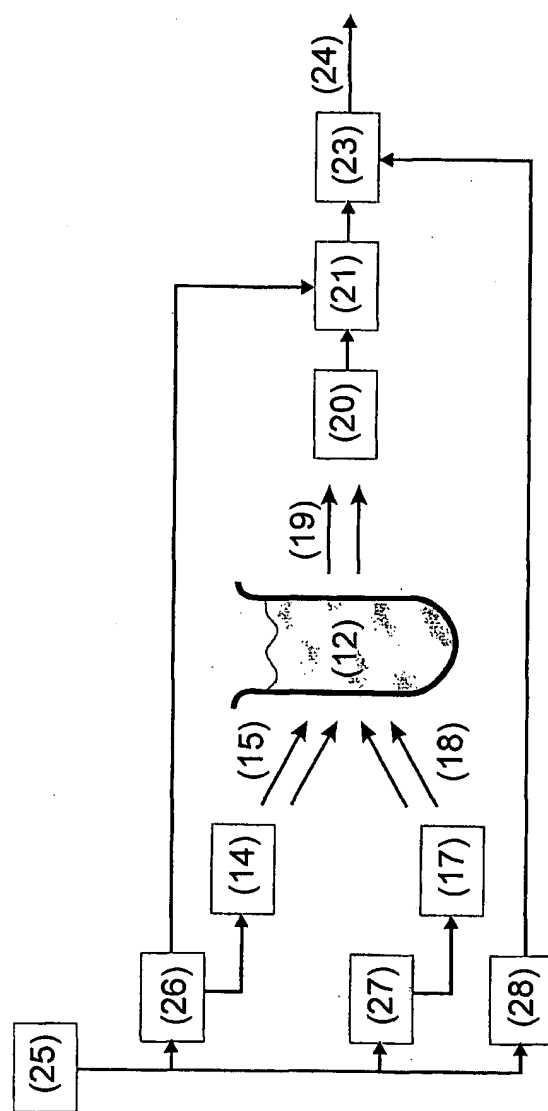


FIGUR 2





FIGUR 3



FIGUR 4

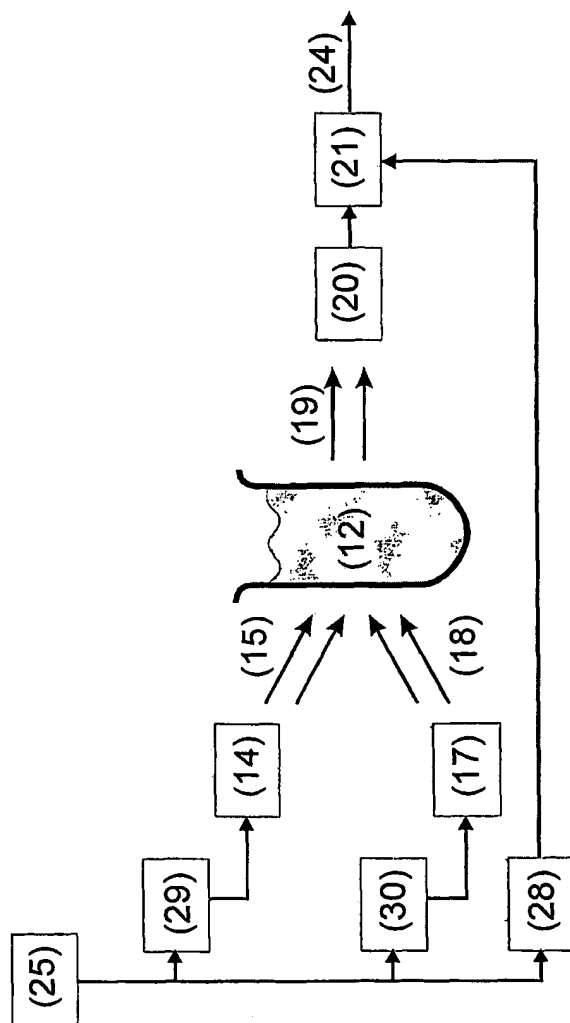
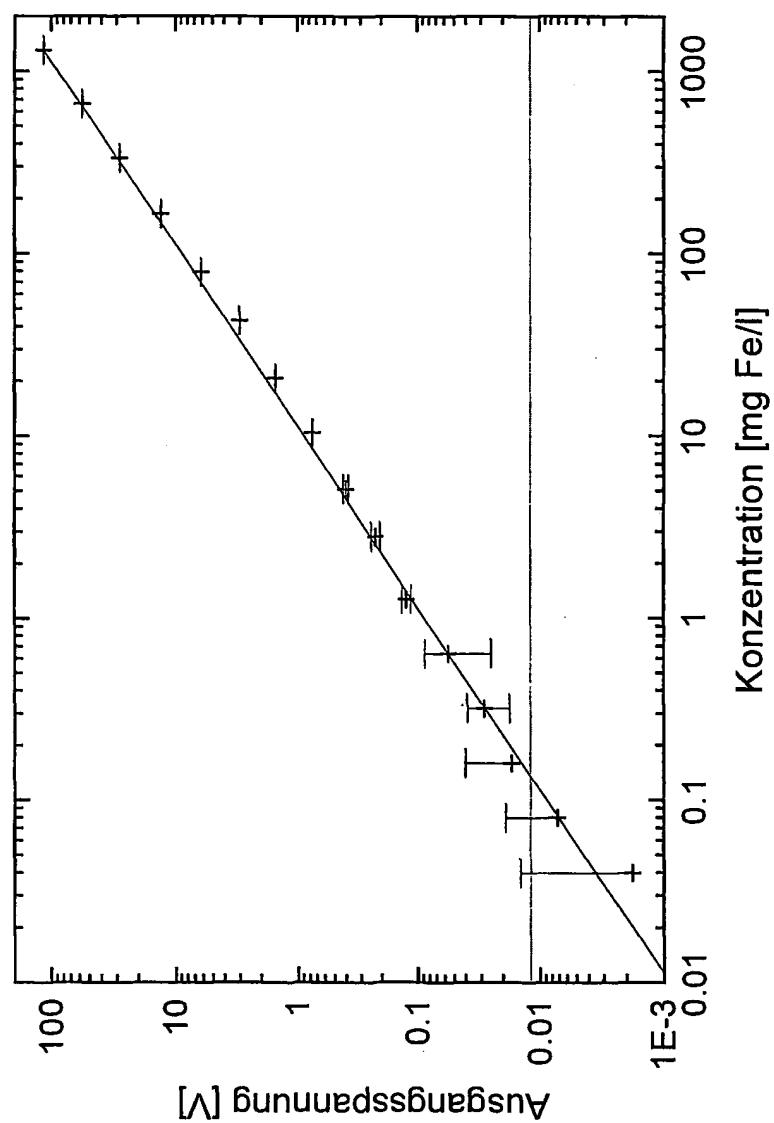
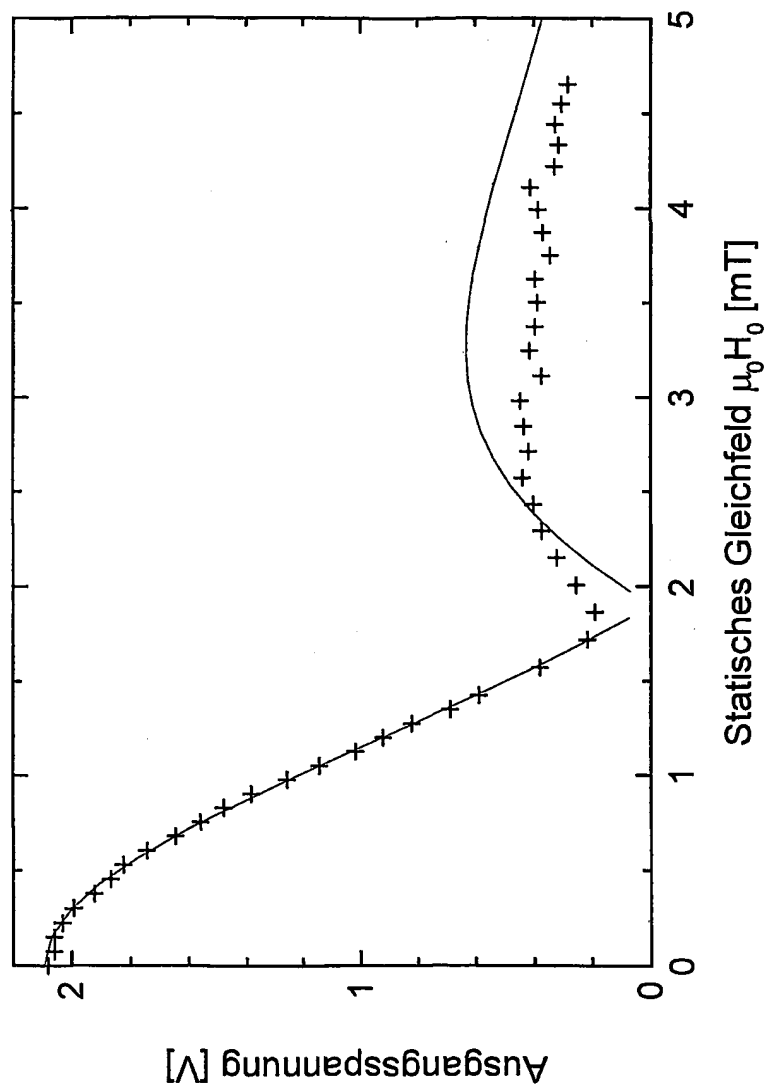


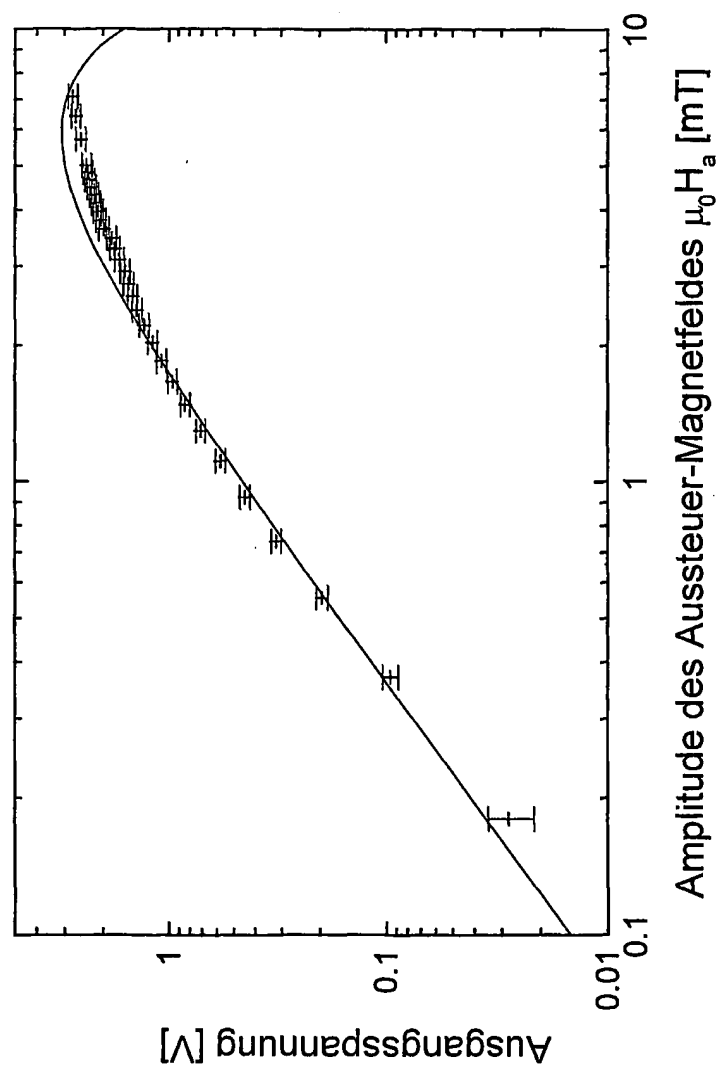
FIGURE 5



FIGUR 6



FIGUR 7



FIGUR 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE2004/000149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N27/74 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 5 005 001 A (CORDERY ROBERT A) 2 April 1991 (1991-04-02)  abstract; figures 1-5 column 2, line 56 -column 4, line 28 ---	1-11  13-27
X Y	US 6 046 585 A (SIMMONDS MICHAEL BANCROFT) 4 April 2000 (2000-04-04)  abstract; figure 4 column 2, line 66 -column 7, line 40 ---	12,23-27  12
Y	WO 00/49407 A (HENNES KILIAN) 24 August 2000 (2000-08-24) abstract; figure 3 page 1-7  ---	12-22
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2004

Date of mailing of the international search report

23/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klein, M-O

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/000149

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 101 26 940 A (CONRADT ROBERT) 5 December 2002 (2002-12-05) the whole document ----	12
Y	GB 1 603 578 A (UNIV GEORGETOWN) 25 November 1981 (1981-11-25) page 1-9; figures 1,4,7,14 ----	13-21
Y	US 6 201 391 B1 (KWUN HEGEON ET AL) 13 March 2001 (2001-03-13) column 6, line 5-56; figure 2 column 3, line 62 -column 4, line 5 ----	13-22
A	US 5 001 424 A (ERICKSON JOHN R ET AL) 19 March 1991 (1991-03-19) the whole document ----	1-27
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 008, no. 141 (P-283), 30 June 1984 (1984-06-30) & JP 59 040287 A (ANRITSU DENKI KK), 5 March 1984 (1984-03-05) abstract -----	13-21



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/000149

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5005001	A	02-04-1991	CA 2039760 A1	06-10-1991
US 6046585	A	04-04-2000	AU 9207998 A	15-06-1999
			BR 9815566 A	31-10-2000
			CA 2311301 A1	03-06-1999
			CN 1128365 B	19-11-2003
			EP 1036328 A1	20-09-2000
			IL 136211 A	10-04-2003
			JP 2001524675 T	04-12-2001
			WO 9927369 A1	03-06-1999
			US 6437563 B1	20-08-2002
			US 6275031 B1	14-08-2001
			US 2001052769 A1	20-12-2001
			US 2001052770 A1	20-12-2001
WO 0049407	A	24-08-2000	DE 19906352 A1	22-07-1999
			DE 19939208 A1	07-09-2000
			AU 4102000 A	04-09-2000
			CA 2370745 A1	24-08-2000
			DE 19946656 A1	24-08-2000
			WO 0049407 A2	24-08-2000
			EP 1198712 A2	24-04-2002
DE 10126940	A	05-12-2002	DE 10126940 A1	05-12-2002
GB 1603578	A	25-11-1981	DE 2837265 A1	06-03-1980
			CA 1157096 A1	15-11-1983
			CH 660799 A5	15-06-1987
			FR 2456951 A1	12-12-1980
			NL 7903965 A	25-11-1980
			SE 440832 B	19-08-1985
			SE 7904329 A	18-11-1980
US 6201391	B1	13-03-2001	NONE	
US 5001424	A	19-03-1991	NONE	
JP 59040287	A	05-03-1984	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2004/000149

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N27/74 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 005 001 A (CORDERY ROBERT A) 2. April 1991 (1991-04-02)	1-11
A	Zusammenfassung; Abbildungen 1-5 Spalte 2, Zeile 56 -Spalte 4, Zeile 28	13-27
X	US 6 046 585 A (SIMMONDS MICHAEL BANCROFT) 4. April 2000 (2000-04-04)	12, 23-27
Y	Zusammenfassung; Abbildung 4 Spalte 2, Zeile 66 -Spalte 7, Zeile 40	12
Y	WO 00/49407 A (HENNES KILIAN) 24. August 2000 (2000-08-24) Zusammenfassung; Abbildung 3 Seite 1-7	12-22
	---	
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Juni 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/06/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Klein, M-O

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2004/000149

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 101 26 940 A (CONRADT ROBERT) 5. Dezember 2002 (2002-12-05) das ganze Dokument ----	12
Y	GB 1 603 578 A (UNIV GEORGETOWN) 25. November 1981 (1981-11-25) Seite 1-9; Abbildungen 1,4,7,14 ----	13-21
Y	US 6 201 391 B1 (KWUN HEGEON ET AL) 13. März 2001 (2001-03-13) Spalte 6, Zeile 5-56; Abbildung 2 Spalte 3, Zeile 62 -Spalte 4, Zeile 5 ----	13-22
A	US 5 001 424 A (ERICKSON JOHN R ET AL) 19. März 1991 (1991-03-19) das ganze Dokument ----	1-27
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 008, no. 141 (P-283), 30. Juni 1984 (1984-06-30) & JP 59 040287 A (ANRITSU DENKI KK), 5. März 1984 (1984-03-05) Zusammenfassung -----	13-21

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2004/000149

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5005001	A	02-04-1991	CA 2039760 A1	06-10-1991
US 6046585	A	04-04-2000	AU 9207998 A	15-06-1999
			BR 9815566 A	31-10-2000
			CA 2311301 A1	03-06-1999
			CN 1128365 B	19-11-2003
			EP 1036328 A1	20-09-2000
			IL 136211 A	10-04-2003
			JP 2001524675 T	04-12-2001
			WO 9927369 A1	03-06-1999
			US 6437563 B1	20-08-2002
			US 6275031 B1	14-08-2001
			US 2001052769 A1	20-12-2001
			US 2001052770 A1	20-12-2001
WO 0049407	A	24-08-2000	DE 19906352 A1	22-07-1999
			DE 19939208 A1	07-09-2000
			AU 4102000 A	04-09-2000
			CA 2370745 A1	24-08-2000
			DE 19946656 A1	24-08-2000
			WO 0049407 A2	24-08-2000
			EP 1198712 A2	24-04-2002
DE 10126940	A	05-12-2002	DE 10126940 A1	05-12-2002
GB 1603578	A	25-11-1981	DE 2837265 A1	06-03-1980
			CA 1157096 A1	15-11-1983
			CH 660799 A5	15-06-1987
			FR 2456951 A1	12-12-1980
			NL 7903965 A	25-11-1980
			SE 440832 B	19-08-1985
			SE 7904329 A	18-11-1980
US 6201391	B1	13-03-2001	KEINE	
US 5001424	A	19-03-1991	KEINE	
JP 59040287	A	05-03-1984	KEINE	